昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, November 2013, 56(11): 1235 - 1243 ISSN 0454-6296

褐飞虱唾液腺中水稻抗性适应基因的分离

陈鹏宇, 刘顺枝, 王小兰*
(广州大学生命科学学院, 广州 510006)

摘要: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål)是一种危害水稻的重要害虫, 在取食水稻时其唾液腺分泌的一些物质能激发水稻产生一系列生理生化反应。为了从褐飞虱唾液腺中得到编码这些分泌物的基因, 本研究运用抑制差减杂交法(suppressed subtractive hybridization, SSH)和镜像选择(mirror orientation selection, MOS)法, 分别以取食抗虫水稻 B5 和敏感水稻 TN1 的褐飞虱唾液腺 cDNA 为 tester 和 driver, 构建了一个含有 768 个克隆子的抑制差减杂交文库。经筛选得到 102 个 EST, 插入序列长 250 ~ 1 000 bp, 代表 35 个单基因。其中 28 个表达上调, 7 个表达下调。经 GenBank 里的 blastx 在线分析工具分析, 除了约 1/3 的转录序列没有相匹配的蛋白质外, 其他 EST 所代表的氨基酸序列与已知蛋白存在不同程度的相似度, 如海藻溏酶、卵黄蛋白原、Ca^{2+}结合蛋白、组织蛋白酶 B (cathepsin B)、黏液样蛋白(putative mucin-like protein)、羧酸酯酶(carboxylesterase)和碳酸酐酶(cah-3 carbonic anhydrase)等, 且多数蛋白含有信号肽, 推测与分泌有关。本研究将为进一步研究刺吸式昆虫中的激发子蛋白奠定了一定的基础。

关键词: 褐飞虱; 抗虫水稻; 抗性适应基因; 激发子; 抑制差减杂交(SSH); 镜像选择技术 (MOS)
中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2013)11-1235-09

Isolation of genes adapted to insect-resistant rice in the salivary glands of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

CHEN Peng-Yu, LIU Shun-Zhi, WANG Xiao-Lan* (School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* (Stål), is an important rice damaging pest. Secretions by salivary glands of the BPH in the process of feeding rice contain some substances that can elicit a series of physiological and biochemical reactions of rice plants. In order to obtain the genes that encode such secretions, a suppressed subtractive hybridization (SSH) library including 768 clones was constructed by SSH and mirror orientation selection (MOS) methods with the BPH fed on the insect-resistant rice B5 as the tester and that fed on the insect-susceptible rice TN1 as the driver. The SSH library contained a total of 102 ESTs with insertions of 250 - 1 000 bp including 35 unigenes, among which 28 were up-regulated while 7 down-regulated. Through analysis by online tool blastx in the GenBank database, we found that the amino acid sequences represented by 2/3 of ESTs showed similarities in different degrees with some known proteins, such as trehalase, vitellogenin, calcium ion binding protein, cathepsin B, putative mucin-like protein, carboxylesterase, and cah-3 carbonic anhydrase. Most of the predicted proteins had signal peptides that might be related to secretion. This study laid a foundation for further research of elicitor proteins of this piercing-sucking insect.

Key words: *Nilaparvata lugens*; insect-resistant rice; host resistance adaptation genes; elicitor; suppressed subtractive hybridization (SSH); mirror orientation selection (MOS)

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) (brown planthopper, BPH)是一种典型的刺吸式昆虫, 通过刺穿水稻韧皮部从中吸取营养, 造成水稻干枯类似"火烧"的现象, 俗称"虱烧"。褐飞虱虫灾暴发会导致大面积的水稻减产, 为此, 各主要稻产区对这一问题进行了大量研究。近几年来, 对褐飞虱的分子生物学研究主要集中在分析其不同性别、不同翅型及发育阶段的转录组(Xue *et al*., 2010)。在更深入的实验中, 研究人员还从褐飞虱的不同组织如唾液腺和肠等鉴定出了差异表达的转录子(Noda *et*

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971912); 广州市羊城学者项目(10A042G)
作者简介: 陈鹏宇, 男, 1990 年生, 广东韶关人, 硕士研究生, 研究方向为植物与昆虫互作, E-mail: harrychan2013@live.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wxl1972@gzhu.edu.cn
收稿日期 Received: 2013-07-09; 接受日期 Accepted: 2013-10-25

al., 2008)。昆虫对植物的取食行为往往造成植物生理生化的改变，在植物与昆虫相互作用的关系中，目前研究的热点是激发子及效应子的分离鉴定及其功能的分析。一般将能够诱导植物寄主防卫反应的生物来源和非生物来源的物质统称为激发子，而将病原物在长期的进化过程中为了能够从植物体内获得更多的营养以利于自身的生长和繁殖，产生能够抑制植物防卫反应的主要是病原物分泌的物质称为效应蛋白。能够编码效应蛋白的基因即为效应基因或效应子。对于昆虫与植物的互作，Bos 等(2010)认为效应蛋白应该是指由昆虫产生的抑制植物产生防卫反应的因子，而激发子是由昆虫产生的诱导植物产生防卫反应的因子。由于唾液腺是褐飞虱取食水稻的消化系统的源头且直接接触所取食水稻，因此推测在褐飞虱的唾液腺中可能存在并表达这些激发子(或效应子)。褐飞虱刺吸水稻的过程，会分泌两种唾液，一种呈凝胶状，用以保护口针；另一种是溶液状唾液，直接分泌到水稻(Sogawa, 1982; Ji *et al*., 2013)，其中的某些成分可能就是刺激植物防卫反应的激发子(Grant *et al*., 2006; Will *et al*., 2007)。在同为刺吸昆虫的蚜虫中已经发现了抑制植物产生防卫反应的效应蛋白(Wu and Baldwin, 2010; Bos *et al*., 2010)。Mutti 等(2006, 2008)鉴定了一个蚜虫唾液腺基因 *COO2*，其产物是一种传递蛋白(deliver protein)，对蚜虫的觅食行为有重要影响。Bos 等(2010)则鉴定了 3 个候选效应子 Mp10，Mp42 和 MpC002，其中 Mp10 诱导了植物的褪绿病(chlorosis)和局部细胞死亡。但是，目前没有报道在褐飞虱体内发现激发子。

在蚜虫与植物的相互作用中，蚜虫中的激发子或效应物具有对宿主防卫反应的激活或抑制特性，但是在褐飞虱的唾液中，存在什么样的激发子或效应物，这些激发子或效应物与抗性水稻防卫反应有怎样的关系，还知之甚少。想要弄清楚这两者之间的关系，特别是研究褐飞虱激发子或效应物在水稻中的靶位点，首要一步是从褐飞虱的唾液腺中分离到可能的激发子或效应物蛋白基因。本研究构建了褐飞虱唾液腺取食抗虫水稻及感虫水稻的 cDNA 的抑制差减杂交(suppressed subtractive hybridization, SSH)文库，经过筛选，我们一共鉴定出 102 个 EST，它们代表了 35 个单基因。通过 NCBI 蛋白质库进行搜索，结果显示这些 EST 所代表的氨基酸序列与一些已知蛋白，如海藻糖酶、黏液样蛋白、卵黄蛋白原和 Ca^{2+} 结合蛋白等的序列有不同程度的相似度，值得注意的是，这些相似蛋白大多是一些分泌性的蛋白，符合一些激发子或效应物的一些基本特性。本研究的结果将为下一步分离鉴定水稻防卫反应的褐飞虱激发子或效应物奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 水稻与褐飞虱

本研究所使用的褐飞虱由武汉大学何光存教授提供。将其放置于温室(温度 25 ± 2℃，相对湿度 70%~80%，光周期 16L∶8D 培养的 1－2 月龄的感虫水稻台中 1 号(TN1)上生长。捕获 3 龄以上褐飞虱若虫，饥饿 24 h 后，根据称重结果，将等量的褐飞虱若虫分别放养于三叶期的感虫水稻 TN1 和抗虫水稻 B5 上。24 h 后，分别回收两种条件下的褐飞虱若虫约 300 头，浸于 70% 乙醇 10 s，然后用 0.85% 的 NaCl 溶液冲洗。在 0.1% 的 PBS 溶液中用精细镊子在解剖镜下分离与收集褐飞虱若虫的唾液腺，浸入 Trizol 溶液暂存。

1.2 总 RNA 提取

用快速试剂盒(QuickPrep Micro mRNA Purification 试剂盒，Amersham Biosciences 公司提供)提取这两种褐飞虱若虫唾液腺的总 RNA，再经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检查总 RNA 的完整性。

1.3 cDNA 的合成

本步骤采用 Clontech 公司的 SMART™ PCR cDNA 合成试剂盒。提取得到的两组 RNA，将取食抗性水稻的一组作为 tester，取食感虫水稻的一组作为 driver，进行抑制差减杂交的第一步，cDNA 的合成。在含 200 ng 总 RNA 中加入 CDS 引物，SMART Ⅱ 寡核苷酸(5′-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3′, 5′-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)N-1N-3-3′，其中 N-1 = ACG; N-3 = ATCG)，42℃下反转录反应 1 h 得到全长 cDNA，往第一链产物中加入 90 μL Tricine-EDTA 缓冲液，72℃保温 7 min 后将稀释的 1 μL cDNA，加入到 100 μL 反应混合物，再加入 5′ PCR Primer Ⅱ A(5′-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3′)进行长距 PCR 扩增，混合物需要先在 95℃下预热 1 min，使 cDNA 变性，之后按如下参数进行 PCR：95℃ 15 s，65℃ 30 s，68℃ 30 min，循环 17 次。所得产物用于构建抑制差减文库。

1.4 抑制差减杂交文库的构建

本步骤采用 Clontech 公司的 PCR-Select™

cDNA Subtraction 试剂盒。参照试剂盒说明书，将上述 tester 和 driver 的 cDNA 以限制性内切酶 *Rsa* Ⅰ消化 3 ~4 h，之后将 tester 分为两组，分别接上对应接头 1 和 2R，36℃下温育 20 h，再 70℃温育 10 min。接着进行两轮杂交和两轮 PCR 扩增，以增加差异表达的转录子。为进一步确保所鉴定的基因存在表达差异，进行镜像选择（mirror orientation selection，MOS）筛选（Rebrikov *et al*.，2000）。用 *Sma*Ⅰ消化的 PCR 产物进行 MOS 杂交后，以 NP2Rs 引物(5′-GGTCGCGGCCGAGGT-3′)进行 MOS PCR。

1.5　SSH 文库的鉴定

取 2 μL MOS PCR 的产物进行纯化，与 pGEM T-easy 载体进行连接，16℃过夜。重组质料转入感受态的大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109，在含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基上培养，挑取阳性克隆，加入 30% 甘油，于 -80℃下保存。用 NPR2S 引物对插入片段进行 PCR 扩增，反应体系为：14.8 μL 消毒后的 ddH_2O，2 μL 10 × *ExTaq* buffer，0.2 μL NPR2S 引物(10 μmol/L)，1.6 μL dNTPs（0.5 mmol/L)，0.2 μL Taq DNA 聚合酶和 1 μL 细菌培养液。在 94℃下温育 5 min 后，按如下参数进行 PCR 反应：95℃ 30 s，68℃ 45 s，72℃ 45 s，72℃ 5 min，循环 30 次。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查扩增效果。

1.6　对 cDNA 差减杂交文库的筛选

用点印迹法对 SSH 文库的 cDNA 进行筛选。取 0.5 μL 经鉴定的阳性克隆的 PCR 产物，点于 0.25 cm^2 的 Hybond-Nylon 膜上，用无菌水和管家基因 *β-actin*2 分别作为阴性、阳性对照。晾干后，在 0.6 N 的 NaOH 溶液中变性 10 min，再转入 0.5 mol/L Tris-HCl（pH 7.5）处理 5 min，用 ddH_2O 漂洗 30 s，120℃烘烤 2 h。根据试剂盒说明书，合成地高辛标记的 DNA 探针。DNA 探针首先与正向差减 PCR 产物进行杂交，选择有杂交信号的片段进行测序。

1.7　序列分析

运用 BioEdit 软件包提供的 ClustalX 对获得的序列进行多重序列比对，使用默认参数设置。同时使用一些网络工具，如 Blast，Blast2GO 软件，搜索同源基因并进行注释和 GO 分析。分泌信号肽的分析使用 SignalP v3.0 程序。

1.8　定量 RT-PCR 分析

为分析 cDNA 微阵列的结果，随机选取 9 个表达上调和 5 个表达下调克隆进行 RT-PCR。把管家基因 *β-actin*2 作为参照，确定相关基因的丰度。再次将取食两种水稻的褐飞虱唾液腺提取总 RNA，并按试剂盒说明书合成第一链 cDNA，之后进行 Real-time PCR，反应体系参照 ABI 7500 Real-time System。*β-actin*2 作为内源参照。每一反应体系包含 12.5 μL 2 × SYBR Green Master Mix Reagent，3.0 μL cDNA 样品，及按每 25 μL 反应液含 200 nmol/L 的量加入的特异引物。所有候选基因的引物由 Primer 3.0 进行设计得到，具体见表 1。按如下参数进行 PCR：先 95℃ 3 min，然后进行 45 轮循环：95℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 40 s。通过分析融化曲线检查反应的特异性，每个克隆进行 3 个重复。

本实验所用到的引物见下表。

表 1　实时 PCR 反应中所用引物
Table 1　Primers for real-time PCR

克隆名称 Clone name	引物序列 Primer sequences	扩增片段大小(bp) Expected size
SG-1A7	F：CAGCCTTCTCACACCCTCTC R：AACGTCGCCAATGTTTATG	123
SG-2A3	F：AAAGCCAACAAAAAGCCTCA R：GGTCATCGACCAGGTAAACG	160
SG-2B6	F：GTGTCTTCAGCCAGGGCTAC R：AGAGAAGAGGGTGCTGCTCA	137
SG-2F5	F：AGTTCAGAGAGACCCGCAAA R：TTGATCCAAAATTGGGCATT	185
SG-4C1	F：AACAGAGCATGGAAGGCATC R：CGGCCGAGGTGTTATTTACT	131
SG-4C9	F：CTTTTCCGCGTCAAGTCTTC R：CCGCGTTTGGTTCTACTGAT	120
SG-4G1	F：GAAGGAACTTCCACGAGCAG R：GTCGAAGTTTGCAGGGACAT	140
SG-4G2	F：ATGACCGATTATTCGGAGGA R：GACCGGTTTCGAGTGGTCTA	162
SG-5C6	F：CTGGGAGAATGGCGTGTAGT R：CGTGGTTGGATCATTGTTTG	150
SG-5G12	F：AAGATGGTTTCGGTGCGTAG R：AAGTCCATGCCAGATTCAGC	189
SG-7F9	F：TATGAAGCCGTTCCTTGGTC R：AGTCCAAATGCTCGGTTCTG	139
SG-8C5	F：GGCTGCACATAAGGACCATT R：GGAGATGGTCGCGGATATTA	119
SG-8C7	F：CTCCTCAGCCTTCTCACACC R：CAACGTCGCCAATGTTTATG	128
SG-8C10	F：GGCACTTGTCGGACTTCTTC R：CAGTCTGTTGTGGGAAAGCA	187

全部引物使用 Premier 3.0 软件根据插入序列而设计。The primers for real-time PCR were designed using Primer Premier 3.0 software according to inserted sequences.

2 结果

2.1 褐飞虱若虫抑制差减杂交文库的构建

取食抗虫水稻 B5 和感虫水稻 TN1 的两种褐飞虱 3 龄以上若虫，提取各自的唾液腺总 RNA，测得 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.97，经电泳检测结果如图 1(A)所示，提取的 RNA 质量较好，达到 SSH 文库构建的要求。两轮差减杂交后，为确定差减效率，以 *β-actin*2 为检测指标，分别以差减和未差减的 cDNA 作为模版，吸取 5 μL 扩增 15，18，21，24 循环的 PCR 产物进行电泳检测，结果如图 1(C)显示，21 轮 PCR 循环后，差减样本的 *β-actin*2 基因几乎检测不到，而在未差减样本中经 18 轮扩增即可明显检测到。差减 cDNA *β-actin*2 基因丰度的减少说明管家基因转录子被有效除去，同时说明 SSH 库可靠。将正向差减的 cDNA 转化大肠杆菌 JM109，经蓝白斑筛选，95% 显示阳性克隆。

2.2 抑制差减杂交文库差异筛选

正向差减库有 768 个阳性克隆，PCR 扩增显示插入片段大小在 250 ~ 1 000 bp，如图 1(B)所示。我们采用点杂交技术和随机引物法标记正向差减和正向未差减 cDNA 探针，再分别与 2 组 cDNA 拷贝膜杂交，如图 2 所示。正向差减探针即用于构建正向差减文库的 MOS 杂交后的 cDNA。两轮筛选后，共鉴定出 102 个差异表达的基因，对这些差异表达的克隆进行测序，除去重复、未知序列，这 102 个 EST 代表 35 个单基因，其中，28 个表达上调，7 个表达下调，结果见表 2。序列的平均长度约 500 bp。

2.3 转录子功能分类

测序结果表明，上述 102 个 EST 中，与 SG-8C7 和 SG-1A7 相同的 EST 分别有 10 个和 9 个，与 SG-446，SG-5G12 和 SG-5-F1 相同的克隆有 7 个。表明这些基因在唾液腺中的表达是高丰度的。有 14 个 EST 只分离到一个单克隆的转录子，表明这些基因表达丰度低(表 2)。经 blastx 搜索表明，共 18 个单基因的编码产物分别与海藻糖酶、嘧啶特异的核苷水解酶、黏液蛋白、卵黄蛋白原、羧酸酯酶(CAR)和 3 种假定蛋白等有较高的相似度。有 14 个 ESTs 用 blastx 没有搜索到匹配的蛋白基因，但是在 BPHest 库中，UNKA(BPH)EST blastx 搜索结果则表明这些 ESTs 与 BPH cDNA 库中的 EST 有很高的相似度。这些转录子可能代表一些褐飞虱唾液腺特异的新基因。为检验这些差异表达基因是否带有 N 端信号肽的分泌蛋白，我们用 SignalP v.3.0 软件预测发现，有 16 个 EST(占已知基因的 72.7%)的对应蛋白质含有信号肽序列(表 2)。包括 SG-2F5 (vitellogenin)、SG-2B6(黏液样蛋白)和 SG-7F9(富含丝氨酸和苏氨酸的 CAR)等。根据 GO 分类(表 3)，这些特异表达基因主要与代谢、脱毒和植物防卫、糖代谢、细胞信号传导等有关(Vontas *et al*., 2000；Small and Hemingway, 2000)。

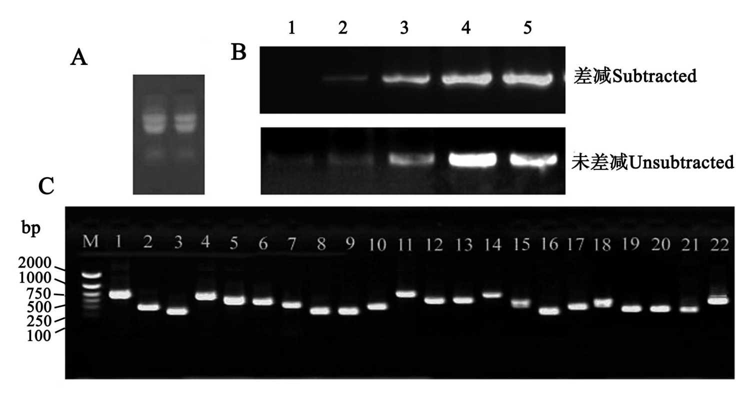


图 1 褐飞虱若虫 SSH 文库的构建与鉴定

Fig. 1 Construction and identification of SSH library of *Nilaparvata lugens* nymphs

A：总 RNA 质量鉴定 Identification of quality of total RNA. B：SSH 文库的检测效率 Detection efficiency of SSH library. 通过分析 *β-actin*2 产物在增加 PCR 循环(18，21，24，27 或 30 轮)的条件下在差减与未差减 cDNA 中的量来测定差减效果。Subtraction efficiency was determined by analyzing the amount of product of *β-actin*2 present in both subtracted cDNA and unsubtracted cDNA by increasing numbers of PCR cycles (18, 21, 24, 27 or 30 cycles). C：正向差减 cDNA 文库的基因片段 Gene fragments of forward subtractive cDNA library. M：DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker；1 – 22：质粒 cDNA 扩增产物 Amplified products of plasmid cDNA.

表 2 文库转录子与 BLAST 注释表

Table 2 List of library transcripts and blast annotation results

克隆 Clone name	最佳匹配 Best database match	来源生物 Original organism	GenBank 登录号 GenBank accession no.	E-value	基因表达 Gene expression
SG-5G12(7)	可溶性海藻糖酶 Soluble trehalase	褐飞虱 *Nilaparvata lugens*	ACN85420	1. E-151	上调 Up-regulated
SG-2A3	类嘧啶特异的核苷水解酶 Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolase rihA-like	丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*	XP_001601919	2. E-11	上调 Up-regulated
SG-2B6	粘液样蛋白 Putative mucin-like protein	灰飞虱 *Laodelphax striatellus*	AEC04824	7. E-28	上调 Up-regulated
SG-2F5	卵黄蛋白原 Vitellogenin	褐飞虱 *Nilaparvata lugens*	AEL22916	2. E-71	上调 Up-regulated
SG-4C4(3)	钙离子结合蛋白 Calcium ion binding protein	褐色橘蚜 *Toxoptera citricida*	AAV31416	1. E-32	上调 Up-regulated
SG-4G1	组织蛋白酶 B Cathepsin B	桃蚜 *Myzus persicae*	DAA06112	2. E-87	上调 Up-regulated
SG-4G2	溶酶体 α-甘露糖苷酶 Lysosomal alpha-mannosidase-like	小蜜蜂 *Apis florea*	XP_003694691	9. E-51	上调 Up-regulated
SG-4H2	卵黄蛋白原 Vitellogenin	褐飞虱 *Nilaparvata lugens*	BAF75351	4. E-90	上调 Up-regulated
SG-5B6	类溶酶体酸性磷酸酶 Lysosomal acid phosphatase-like	非洲象 *Loxodonta africana*	XP_003412297	3. E-21	上调 Up-regulated
SG-5C6(3)	类无机磷酸共转运体蛋白 Putative inorganic phosphate cotransporter-like	丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*	XP_001607837	2. E-67	上调 Up-regulated-regulated
SG-6H2	碳酸酐酶 Carbonic anhydrase	冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*	ABF66619	2. E-43	下调 Down-regulated
SG-7F9(2)	羧酸酯酶 Carboxylesterase	褐飞虱 *Nilaparvata lugens*	AFH01341	2. E-74	上调 Up-regulated
SG-8C9	卵黄蛋白原 Vitellogenin	西方蜜蜂 *Apis mellifera*	NM_001011578	5. E-109	上调 Up-regulated
SG-8C10(2)	CG7646, isoform B	黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*	NLSG2276	2. E-56	上调 Up-regulated
SG-8C11	几丁质寡聚糖 β-乙酰葡糖胺酶前体 Chitooligosaccharidolytic beta-N-acetylglucosaminidase precursor	家蚕 *Bombyx mori*	NP_001037466	2. E-63	上调 Up-regulated
SG-5F1(7)	假定蛋白 Hypothetical protein	钳蝎 *Tityus discrepans*	CAY61860	1. E-07	上调 Up-regulated
SG-5F12(3)	胰三酰甘油脂肪酶 Pancreatic triacylglycerol lipase	火鸡 *Meleagris gallopavo*	XP_003208228	8. E-26	上调 Up-regulated
SG-8B12	类真核生物启动因子蛋白 Eukaryotic initiation factor-like protein	短猛蚁 *Brachymyrmex patagonicus*	ADX36410	2. E-77	上调 Up-regulated
SG-8C5(2)	预测蛋白 Predicted protein	褐飞虱 *Nilaparvata lugens*	NLNA7561	2. E-26	下调 Down-regulated
SG-8F6	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLNA7442	0.0	上调 Up-regulated
SG-1A7(9)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLHT6566	0.0	上调 Up-regulated
SG-4B4(2)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLSG4793	2. E-63	上调 Up-regulated
SG-4C1(3)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLEA4773	0.0	下调 Down-regulated
SG-4D1	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLSG4217	0.0	上调 Up-regulated
SG-4G9	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLSG4137	1. E-147	下调 Down-regulated
SG-4H6(7)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLSG4217	1. E-180	上调 Up-regulated
SG-5B1(2)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLSG1805	0.0	下调 Down-regulated
SG-5F10(4)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLSG4775	0.0	上调 Up-regulated
SG-5F11(2)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLEA4773	0.0	上调 Up-regulated
SG-5G12(2)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLSG2840	0.0	下调 Down-regulated
SG-6A2(2)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLTH5145	0.0	上调 Up-regulated
SG-7E10(7)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLNA6699	0.0	上调 Up-regulated
SG-8A12(7)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLSG1651	0.0	上调 Up-regulated
SG-8C7(10)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLSG2840	0.0	下调 Down-regulated
SG-8C8(2)	EST	褐飞虱 *N. lugens*	NLNA6699	0.0	上调 Up-regulated

克隆名后面括号中的数值代表 cDNA 微阵列筛选的重复数。The numbers in brackets behind the clone names represent the number of replications in cDNA microarray screening assay.

表 3 差异表达转录子的 GO 分析

Table 3 Gene ontology analyses of differentially expressed transcripts

克隆 Clone name	NR 数据库最佳匹配 Best database match to NR	GO 基因注释(生物反应) GO terms (biological process)	是否有信号肽 With signal peptide	核苷酸序列一致性(%) Nucleotide identity
SG-5G12	可溶性海藻糖酶 Soluble trehalase	GO：0034605：细胞对热反应 Cellular response to heat；GO：0009267：细胞对饥饿反应 Cellular response to starvation；GO：0005993：海藻糖分解代谢 Trehalose catabolic process；GO：0005991：海藻糖代谢 Trehalose metabolic process	+	99
SG-2A3	类嘧啶特异的核苷水解酶 Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolase rihA-like	GO：0046133：嘧啶核苷分解代谢 Pyrimidine ribonucleoside catabolic process	+	53
SG-2B6	粘液样蛋白 Putative mucin-like protein	GO：0044267：细胞蛋白代谢 Cellular protein metabolic process	+	55
SG-2F5	卵黄蛋白原 Vitellogenin	GO：0007296：卵黄形成 Vitellogenesis；GO：0048477：卵子形成 Oogenesis	+	81
SG-4C4	钙离子结合蛋白 Calcium ion binding protein	GO：0008591：Wnt 受体信号通路的调控 Regulation of Wnt receptor signaling pathway，Ca^{2+} 调控途径 Calcium modulating pathway	+	80
SG-4G1	组织蛋白酶 B Cathepsin B	GO：0050790：分解代谢活动调节 Regulation of catalytic activity	+	95
SG-4G2	类溶酶体 α-甘露糖苷酶 Lysosomal alpha-mannosidase-like	GO：0006013：甘露糖代谢 Mannose metabolic process	+	99
SG-5B6	类溶酶体酸性磷酸酶 Lysosomal acid phosphatase-like	GO：0001501：骨骼系统发育 Skeletal system development	+	36
SG-5C6	类无机磷酸共转运体蛋白 Putative inorganic phosphate cotransporter-like	GO：0044419：种间互作 Interspecies interaction between organisms；GO：0006814：Na^{+} 转运 Sodium ion transport	+	54
SG-5F12	胰三酰甘油脂肪酶 Pancreatic triacylglycerol lipase	GO：0016042：磷脂分解 Lipid catabolic process	+	51
SG-6H2	碳酸酐酶 Cah-3 carbonic anhydrase	GO：0008152：新陈代谢 Metabolic process	+	62
SG-7F9	羧酸酯酶 Carboxylesterase	GO：0008150：生物过程 Biological process	+	97
SG-8B12	类真核生物启动因子蛋白 Eukaryotic initiation factor-like protein	GO：0006413：翻译起始 Translational initiation	+	89
SG-8C11	几丁质寡聚糖 β-乙酰葡糖胺酶前体 Chitooligosaccharidolytic beta-N-acetylglucosaminidase precursor	GO：0006032：几丁质分解代谢 Chitin catabolic process	+	90

取食抗虫水稻的适应基因，为进一步研究水稻与褐飞虱的互作奠定基础。经过差异筛选，得到 102 个 EST，在 GenBank 查找这些基因的同源序列，102 个基因中有 18 个显示与已知序列有同源性，且多个基因的编码产物具备了激发子的初步特性，即为分泌蛋白。如 SG-2B6 和 SG-2F5 分别代表黏液样蛋白(putative mucin-like protein)和卵黄蛋白原(vitellogenin)，黏液样蛋白可能与褐飞虱的刺吸吸食的特性有关(Noda *et al.*，2008)；SG-5G12 代表可溶性海藻糖酶(soluble trehalase)，参与昆虫的能量代谢(Gu *et al.*，2009)；SG-4C4 是一种钙离子结合蛋白(calcium ion binding protein)，在植食性昆虫取

食过程起到影响植物 Ca^{2+} 涌入(Ca^{2+} influx)进而抑制其防卫反应的作用(Hogenhout and Bos, 2011); SG-4G1 与一种组织蛋白酶 B(cathepsin B)相似，Foissac 等(2002)在褐飞虱肠组织中也发现了有蛋白酶活性的类组织蛋白酶 B(cathepsin B-like)的表达。

黏液样蛋白和卵黄蛋白原形成基因出乎意料地在唾液腺中大量表达，进一步查阅文献，发现与 Noda 等(2008)研究结果一致。Noda 等(2008)在对褐飞虱的不同组织转录组测序发现黏液样蛋白及卵黄蛋白原形成基因在褐飞虱唾液腺大量存在，且卵黄蛋白原形成基因除了在褐飞虱唾液腺中高丰度表达，在腹部(abdomen)组织也大量表达。在本研究中，这两个基因出现表达上调：黏液样蛋白的表达上调可以理解为保护口针而增加分泌量；而卵黄蛋白原的表达上升，则可能是受到取食结果影响后，褐飞虱为繁殖进行准备。卵黄蛋白原本身是一种重要的营养物质，在昆虫的血液中大量存在，其合成不仅仅在卵母细胞进行，也在昆虫的其他器官如脂肪体中合成，然后转运到卵母细胞储存中，参与卵黄的形成、胚后发育等生理过程。因此，褐飞虱唾液腺中卵黄蛋白原基因的表达上调可能是为繁殖作准备。然而为什么是在取食抗性水稻后引起的表达上调，推测可能是褐飞虱在适应抗性水稻的过程中产生某些信号，能使机体能做出积极响应，更高效地吸收营养物质，并进行储存。

随着分子生物学技术的发展，人们对褐飞虱与水稻的关系不再仅仅停留在宏观层次的研究与分析，已经可以从微观水平得到更为详细与具体的解释。与动物的免疫系统类似，植物对草食性昆虫的取食行为有独特的反应机制。这套机制以一个复杂精密的信号网络为骨架，在植物接受相关信号刺激后，会改变植物自身的转录组、蛋白质组以及代谢组，这些信号包括草食性昆虫的物理、化学信号，如植物源的或昆虫源的充当激发子的物质。对于昆虫源的激发子，若要发挥激发作用，应该具有分泌特性。褐飞虱的刺吸行为表现出抑制植物的防卫反应，目前普遍认为造成这一现象是由于飞虱唾液腺中分泌的激发子所产生(Kamoun, 2007; Hogenhout *et al*., 2009)。在同为刺吸式昆虫的蚜虫研究中，已经分离到几个激发子，而在褐飞虱中，还没有确切的唾液腺激发子报道。我们的研究结果显示，当褐飞虱取食抗虫水稻时，褐飞虱唾液腺许多基因的表达发生了变化，这些基因的蛋白产物大部分是含有信号肽的，亦即是分泌性的，具备了充当昆虫源的蛋白激发子或效应物的必要条件。再根据相似蛋白的功能进行分析，这些蛋白有一部分是一些酶类，它们是否能在一定程度上保持活性，抑或像其他外非酶的外源蛋白一样仅充当信号分子或抗原，进而引起植物的代谢的改变，这需要进一步研究。目前已经有关于褐飞虱取食导致的水稻代谢变化的研究，可以根据这些代谢产物的变化作为评价一些物质是否为激发子或效应物的标准。我们的研究为后续鉴定褐飞虱唾液腺分泌物中可能的激发子或效应物奠定基础。

参考文献(References)

Bos JIB, Prince D, Pitino M, Maffei ME, Win J, Hogenhout SA, 2010. A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (green peach aphid). *PLoS Genetics*, 6(11): e1001216.

Foissac X, Edwards MG, Du JP, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, 2002. Putative protein digestion in a sap-sucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper; *Nilaparvata lugens*: Delphacidae) - identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(9): 967-978.

Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL, 2006. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60: 425-449.

Gu J, Shao Y, Zhang C, Liu Z, Zhang Y, 2009. Characterization of putative soluble and membrane-bound trehalases in a hemipteran insect, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Insect Physiology*, 55(11): 997-1002.

Hogenhout SA, Bos JI, 2011. Effector proteins that modulate plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4): 422-428.

Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S, 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 22: 115-122.

Ji R, Yu H, Fu Q, Chen H, Ye W, Li S, Lou Y, 2013. Comparative transcriptome analysis of salivary glands of two populations of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, that differ in virulence. *PLoS ONE*, 8(11): e79612.

Kamoun S, 2007. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4): 358-365.

Liu CX, Hao FH, Hu J, Zhang WL, Wan LL, Zhu LL, Tang HR, He GC, 2010. Revealing different systems responses to brown planthopper infestation for pest susceptible and resistant rice plants with the combined metabonomic and gene-expression analysis. *Journal of Proteome Research*, 9(12): 6774-6785

Mutti NS, Louis J, Pappan LK, Pappan K, Begum K, Chen MS, Park Y, Dittmer N, Marshall J, Reese JC, Reeck GR, 2008. A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(29): 9965-9969.

Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reeck GR, 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Journal of Insect Science*, 6: 38

Noda H, Kawai S, Koizumi Y, Matsui K, Zhang Q, Furukawa S, Shimomura M, Mita K, 2008. Annotated ESTs from various tissues of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: a genomic resource for studying agricultural pests. *BMC Genomics*, 9: 117

Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS, Lukyanov SA, 2000. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Research*, 28: e90.

Small GJ, Hemingway J, 2000. Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 9(6): 647 – 653.

Sogawa K, 1982. The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. *Annual Review of Entomology*, 27: 49 – 73.

Vontas JG, Small GJ, Hemingway J, 2000. Comparison of esterase gene amplification, gene expression and esterase activity in insecticide susceptible and resistant strains of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Insect Molecular Biology*, 9: 655 – 660.

Wang X, Zhou G, Xiang CY, Du MH, Cheng JA, Liu SS, Lou YG, 2008. β-glucosidase treatment and infestation by the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*, elicit similar signaling pathways in rice plants. *Chinese Science Bulletin*, 53: 53 – 57.

Will T, Tjallingii WF, Thönnessen A, van Bel AJ, 2007. Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(25): 10536 – 10541.

Wu J, Baldwin IT, 2010. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annual Review of Genetics*, 44: 1 – 24.

Xue J, Bao YY, Li BL, Cheng YB, Peng ZY, Liu H, Xu HJ, Zhu ZR, Lou YG, Cheng JA, Zhang CX, 2010. Transcriptome analysis of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE*, 5(12): e14233.

（责任编辑：赵利辉）